# (45) 発行日 平成10年(1998) 2月4日

(24)登録日 平成9年(1997)10月17日

(51) Int.Cl.*		識別記号	庁内整理書号	FI			技術表示簡素
C12N	1/21			C12N	1/21		
C12P	21/02			C12P	21/02	С	
# C12N	15/09		9282 - 4 B	C12N	15/00	Α	
(C12N	1/21						
C12R	1:125)						

	- <del>   -</del>				請求項の数8(全 10 頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特膜昭63-3848	32		(73)特許權者	99999999	-
					昭和電工株式会社	
(22)出願日	炤和63年(1988)	2月23日		7 1 20	東京都港区芝大門1丁目	13番9号
				(72)発明者	埼元 和範	
(65)公開番号	特別平1-21528	30 🗸	2		東京都大田区多摩川 2 一2	24-25 昭和電
(43)公開日	平成 1 年 (1989)	8月29日			工株式会社生化学研究所	4
	A 19			(72)発明者	高橋 薫	
					東京都大田区多摩川 2 2	4-25 昭和電
- 60	do .				工株式会社生化学研究所向	4
				(72)発明者	矢島 善博	
			7 .	,	東京都大田区多摩川 2 一2	4-25 昭和電
			1	,	工株式会社生化学研究所	척
			-	(72)発明者	久留 由美子	
	14.5		1		東京都大田区多摩川 2-2	4-25 昭和電
				1.3	工株式会社生化学研究所	4
			-	(74)代理人	弁理士 青木 朗 (外	4名)
			1	審査官	植野 浩志	

### (54) 【発明の名称】 微生物の改良

# (57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝 子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該 目的遺伝子のための発現制御配列が、該目的遺伝子の発 現を制御することができる位置及び方向で導入されてい る改良された微生物であって、前記発現制御配列が、聴 発現制御配列の一端又は両端に付加された削記目的遺伝 子のDNA配列の部分と相補的な配列による相同的交叉に より導入されたものであることを特徴とする微生物。

【請求項2】前記徴生物がパチルス (Bacillus) 属微生 10 物である請求項1に記載の微生物。

【請求項3】前記数生物がパチルス・ズブチリス (Bac1 ilus subtillis) 又はパチルス・アミロリクエファシエ ンス (Bacillus amyloliquefaciens) である請求項2に 記載の微生物。

【請求項4】 前記発現制御配列がプロモーターであり、 該プロモーターが前記遺伝子の上流に押入されている、 請求項1~3のいずれか1項に記載の微生物。

【請求項5】該プロモーターがパチルス属徴生物のプロ モーター又は、パチルス属徴生物のファージのプロモー ターであり、該プロモーターが前記遺伝子の上流に挿入 されている、請求項4に記載の微生物。

【請求項6】前記遺伝子がトリプトファンの合成に係る 遺伝子である請求項1~5のいずれか1項に記載の敬生

【請求項7】目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝 子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該 目的遺伝子のための発現制御領域を、該目的遺伝子の発 現を増強することができる位置及び方向で導入すること を特徴とする改良された微生物の製造方法において、前

記発現制御配列を、該発現制御配列の一端又は両端に付加された前記目的遺伝子のDN配列の部分と相補的な配列による相同的交叉により導入することを特徴とする方法。

【請求項8】特許請求の範囲第1項に記載の整生物を培養して該遺伝子に祭わる生成物を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴とする有用物質の製造方法

# 【発明の詳細な説明】

# (産業上の利用分野)

本発明は有用微生物の新規な改良方法及び該改良方法 により製造された微生物、並びに該強生物を用いる有用 物質の製造方法に関する。本発明の似生物の改良方法 は、既存の遺伝子を含まる異色体に、終選伝子の発見 を制御することができる発展的問題列を外部から導入す ることを特徴とする。

# (従来の技術)

理検えDNA技術の発展、進歩によってホルモン、ワクテン、インターフェロン等の蛋白質や酵素、アン酸、さらにピタランや抗生物質が可能となった。これは、物質生産に係わる特定の遺伝子を適当な参コピー数のブラスミドへの大きに変した。これは、物質生産に係わる特定の遺伝子を適当な参コピー数を通り、物質生産に係わる海人した遺伝の高いプロモーター遺伝子を有するプラスミドベクターを用いて、フロモーター遺伝子と目が退たので、ボウェータにより、遺伝子の失助は上の外に行われる。しかしながら、プラスミドの設落が起これが、プラスミドに変奏や火火が生じる等の為、プラスミドベクターを用いた物質生産に一般的に不安度であ、プラスミドベクターを用いた物質生産に一般的に不安度であり、プラスミドベクターを用いた物質生産に一般的に不安度であり、プラスミドで変奏や火火が生じる等のある。

これに代る方法として、宿主敬生物の染色体に目的遺伝子をインテグレーションせしめる方法があり、この方法によれば外部から導入された遺伝子を多世代にわたって安定に維持することができるが、改遺伝子の増幅度を上げるとが図離であり、このため目的とする生成物の生産性に限界があるという欠点が存在する。

## (発明が解決しようとする課題).

使って、目的の物質に係る遺伝子が染色体に安定に維持されており、しかも該遺伝子が強力に発現され、目的 物質を効率よく生産することができる独生物及びその創 成方法が強く求められている。

## (課題を解決するための手段)

本発明者等は、上記の問題点を解決すべく種々検討した結果、特定の目的物質の生産に係わる遺伝子をすでに合有する原生物染色体に、鉄速伝子の発現を指数することができる強力なプロモーターを導入することにより、目的物質を効率よく生産することができる敵生物が得られることを見出し、この条明を完成した。

従って、本発明は、目的物質の生産に係わる遺伝子 (目的遺伝子) を含有する染色体を有する微生物の故也 色体に、該目的遺伝子のための発現制御配列が、該目的 遺伝子の発現を制御することができる位置及び方向で道 入されている改良された微生物であって、前記発現制御 配列が、該発現制御配列の一類又は両端に付加された前 記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補助的な配列による 相同的交叉により導入されたものであることを特徴とす る養生物;目的物質の生産に係わる遺伝子(目的遺伝 10 子)を含有する染色体を有する微生物の該染色体に、該 目的遺伝子のための発現制御領域を、該目的遺伝子の発 理を増強することができる位置及び方向で導入すること を特徴とする改良された似生物の製造方法において、前 紀発現制御紀列を、該発現制御配列の一端文は雨端に付 加された前記目的遺伝子のDNA配列の部分と相補的な配 列による相同的交叉により導入することを特徴とする方 法:並びに、該衛生物を培養して該債伝子に係る生成軸 を生産せしめ、そして該生成物を採取することを特徴と する有用物質の製造方法、を提供しようとするものであ 20 ð.

# (具体的な説明)

本発明は、目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその 染色体中に有し該目的物質を生産することができる微生 物、及び目的物質の生産に係る遺伝子をすでにその染色 体中に有するが該目的物質を実質上生産することができ ず新たに外部から発現制御遺伝子を進入することにより 該目的物質を生産することができる様になる微生物。の いずれにも適用することができる。この様な微生物とし て、例えばパチルス(Bacillus)属、エシェリシア(Es cherichia) 属、セラチア (Seratia) 属、シュードモナ ス (Psudomonas) 属、ブレビパクテリウム (Brevibacte rium) 属、コリネパクテリウム (Corynebacterium) 属 等に属する微生物を挙げることができる。バチルス属に 異する敬生物の例として、例えばパチルス・ズブチリ ス、パチルス・アミロリクエファシエンス、パチルス・ リケニホルミス、パチルス・ステアロサーモフィラス等 を挙げることができる。

本発明の方法によび製造される目的物質は、遺伝子の 直接的な発現を出物である蛋白質又はポリペプチド、例 えば各種の需素類、例えばプロテアーゼ、アミラーゼ、 グルコースイソメラーゼ、セルラーゼ、トリプトファン シンセターゼ、各種のペプチド性ホルモン類、例えばイ ンシュリン、成長ホルモン、エンケファリン、ポリオワ クチン、各種のが原類、例えば肝炎ワクチン、ポリオワ クチン、へルベスワクチン;各種のリンホカイン類、例 えばインターフェロン、インターロイキン等であること かできる。

本発明の方法により製造される目的物質はまた、遺伝 子の直接的発現生成物である1又は複数の酵素の触媒作 50 用により生産される物質であることができる。この様な

物質の例として複数のトリプトファン合成関連酵素によ り合成されるレートリプトファン、複数のスレオニン合 成関連酵素により合成されるL-スレオニン、複数のプ リンヌクレオチド合成酵素により合成されるイノシンや グアニン等を挙げることができる。この様な目的物質の 生産に保わる遺伝子としては、宿主衛生物の必免体中に 本来存在する遺伝子であってもよく、又あらかじめ宿主・ 磁生物の染色体中に人為的に挿入しておいた遺伝子であ ってもよい。前者の遺伝子はその遺伝子に天然に付験す る発理制御配列を有しており、これに加えて本発明の方 10 法により追加の発現制御配列を挿入することにより、物 主による目的物質の生産を増強することができ、あるい はもともと目的物質を実質的に全差しなかった宿主に目 的物質を生産する能力を付与することができる。後者の 場合も、多く場合その構造遺伝子に付随する発現制機解 城を有しており、本発明の方法による強力な発現制御配 列を導入することにより、前記のごとき効果を得ること ができる。あらかじめ挿入された遺伝子がその発現制御 配列を伴っていない場合には、そのまま宿主徴生物は目 的物質を生産することができないが、本発明の方法によ り発現制御配列を人為的に挿入することにより談審主徴 生物に目的物質を生産する能力を付与することができ る。この様は遺伝子を含有する微生物の具合例として、 枯草菌類のトリプトファン合成に係わる遺伝式とタロラ ムフェニコール耐性遺伝子を試験管内でライゲーション せしめ、トリプトファン生産菌である岩草葡萄の染色体 中に両遺伝子をインテグレーションさせることにより創 製された、安定的に両遺伝子産物及びトリプトファン生 産する微生物が挙げられる (特開昭61-85184. 及び特 野昭61-88873)。

発現制器配列としては例えばプロモーター、ターミネーター、50度別、オペレーターが挙げられ、これらは特定の発現制度別に依けして適常は最後外にあらかしめ存在する。目的物質の生産に係力を構造遺伝子の上海又は下液に、接種遺伝子の転び方向に合わせて挿入される。前記制御展列の典型的な例はプロモーターであった。これは一般に前に構造遺伝子の上底に該構造遺伝子の転写方向に合わせて挿入される。例えば、ある特定の領土敬生物については、該生物・ド天然に存在するプロモーターをクローン化したもの、双は該数生物のアケージ 40年に天然に存在するプロモーターをクローン化したもの、あるいはこれらのプロモーターに対応に存在するプロモーターに対応に存在するプロモーターにサービーターを使用することができる。プロモーターはまた、化学合成されたものであってもよい。

挿入すべき発現制質領域は画常、宿主微生物中で増編 することができるブラスミドにより、あるいは宿主微生 物中で増編することができない異状文は線状のDMAとし で導入される。目的とするDMAを宿主微生物に導入する ための方法として、DMAを組肥に挿入するために通常用 いられる方法のいずれか、例えばカルシウムセル法(文 献J. Bacierioi., <u>119</u>,1072(1974))、コンピテントセ ル柱 (文献Cene. <u>I</u>, 153 (1977))、プロトプラスト形 質転換佐 (Molec. Gen. Genet. <u>168</u>,111 (197))等を用い ることができる。

プロモーター等の発現制節配列を宿主徴生物の染色体 にインデグレーションする方法としては一般に、いわゆ る相同的交叉が用いられる、このため、挿入されるべき 制御配列はその一類又は両隔に、先色体にすでに存在し ている目的生成物の生産に係わる遺伝子のBNA配列と相 同なDM配列を有することが好ましい。

本明細書においては、具体例として、宿主放生物としてバチルス・アミロリクエファシエンスを用い、目的物質の生産に併わる遺伝子としてトリプトファンオペロンを構成する遺伝子を用い、発現制物展列をしてバチルス・アミロリクエファシエンス由来のプロモーター又はバチルス・ズブチリスに感染する5702ファージ由来のプロモーターを用いる。以下に、この具体例を実施例として記載する。

なお、実施例において酵素反応条件はおよそ次の通り 20 とした。

Hind III 1854

反応媒体:100mM Tris-Ecl (pH7.5),50mM NaCl,5m M MgCl<sub>2</sub>

酵素量 :DNA1μgに対して5ユニット 反応条件:37℃にて60分間 Hind III部分消化

反応媒体:100mM Tris-HC! (pH7.5),50mM NaCl,5m

酵素量 :DNA1μgに対して0.1ユニット~1ユニッ

反応条件:37℃にて60分間

Sma I 消化 反応媒体:10mM Tris-HCl (pH8.0),20mM KCl,7mM MgCl:

酵素量 :DNA1μgに対して10ユニット 反応条件:37℃にて60分間

Xba 1 消化

反応条件:100mM Tris-HC! (pH7.5),50mM NaC!,5mM McC!,5mM McC!,

酵素量 :DNA1μgに対して5ユニット 反応条件:37℃にて60分間

EcoR 1消化

反応媒体:100mM Tris-HCl (pH7.5)、50mM MaCl,5m M MgCl;

酵素量 :DNA1μgに対して5ユニット

反応条件:37℃にて60分間

BanH 1941t.

反応媒体:100mM Tris-HCl (pH7.5),50mM NaCl,6m M MgCl:

酵素量 :DMAIμgに対して10ユニット

皮店条件:37℃にて60分間 DNAポリメラーゼ I

Klenowフラグメント

(pol I) 如理 100mM Tris-HCl (pH7.5),50mM NaCl. 5mM MgCl2の緩衝液中で消化された1 μgのDNA (20 μ 2) に対して、NNAポリメラーゼI・Klenowフラグメン トを3ユニット(1μℓ)、各dXTP2n mole (2mM容液を 1 μℓ) 加え、室温で30分間インキュペーションする。 細菌アルカリ性ホス

ファーターゼ (BAP)

処理 制限酵素で消化された1μg DNA溶液に対して 0.3ユニットのBAPを加え、55℃、30分間インキュベーシ ョンする。

T4 NDAガーゼ

による連結 100mM Tris-HC! (pH7.5),50mM NaCl.5 - , mM MgCl₂ 中で消化された各DNA溶液を混合後、100 μ M に なる様にATPを加え、さらにT4 DNAリガーゼを30ユニッ ト蚕加し、15℃で1夜インキュペーションする。

実施例1. パチルス・アミロリクエファシエンスからのプ ロモーターのクローニング及びマーカーの付与(第1 図)

まず、プロモーター検索ベクターpGR71 (Nature, 293. 309 (1981) Gold(arb, D. S. et al.) (このベクターは当 業界において広く使用されており、容易に入手すること ができる。)を制度酵素Hind IIIで消化し、これと同じ く制限酵素Rind IIIで消化したパチルス・アミロリクエ ファシエンスIAM 1521の染色体DNAとを試験管内で混合 し、T4 DNAリガーゼを用いて連絡反応を行った後、パチ ルス・ズブチリスUOT 0531 (東京大学応用微生物研究 所) にプロトプラスト形質転換法 (S. Chang & S.N. Coh 30 en, Molec.gen.Genet. 168, 111 (1979) ) で導入し、25pp gのクロラムフェニコールを含むL窓天ブレートに生え る形質転換体を多数取得した。次にこの形質転換体のク ロラムフェニコール耐性度およびクロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼの活性を測定し、活性が一 番高い形質転換体パチルス・ズブチリスTFK756を高活性 プロモーターがクローン化されている味として強んだ。 TFK756からプラスミドを分離・精製し、クローン化され ていた0.3MDの大きさのHind III所片DNAをプロモーター 括性を有する配列P756と命名、P756がクローン化された pGR 71をDSDK 756と命名した。

次にpSDK 756のP756プロモーターの上流にマーカーと してのテトラサイクリン耐性遺伝子を組込む為に枯草菌 プラスミドpTPSを制限酵素Bindl!!で消化し、これと同 じく制限酵素Flind IIIで部分消化したpSDK 756とを混合 し、T4 DNAリガーゼを用いて結合反応を行った後、大腸 歯C600に形質伝換を行い、テトラサイクリン耐性で、か つクロラムフェニコール耐性となる形質転換体を得た。 これによりpSDX 756のP756上流に1.5MDのテトラサイク リン耐性液伝子を組込んだプラスミッドpSDE27364を作 60 3プCで1 夜培養後に、テトラサイクリン耐性の形質転換

さらに図1に示したようにまずpSDK 27364を制限酵素 Rind IIIで部分消化し、Klenow Pragmentと4種のXTPを 角いて、平滑末端を作った。次に、Sma [で消化しBAPで 脱リン酸化したpUC 18と混合し、T4 DNAリガーゼを用い て総合反応を行い、大脳菌JN 109に形質転換を行い、ブ ラスミ KpSDK27365を含む、アンピシリン、テトラサイ クリン耐性を示す形質転換体をスクリーニングした。こ れにより、テトラサイクリン耐性のマーカーが付与され たP756を有するDNA断片の識型ができるプラスミドが取

10 得された。 事集例2. プロモーターP756選入用DNAの調製及び宿主株

への導入(第2図)

前記プラスミドpSDK 27365をEcoR I及びXba Jで消 (た) アガロース電気泳動により分離し、フェノール抽出 及びエタノール沈素により精製することにより、テトラ サイクリン耐性遺伝子及びプロモーターP756を含有する 1.20DのEcoR I-Xba 1断片を調製した。

→方、パチルス・アミロリクエファシエンスのトリプ トファン合成系遺伝子が大腸菌プラスミドpBR322にクロ ーニングされているプラスミ KpSDT1111を制度酵素EcoR 1及びXba lで消化し、アガロースケル電気泳動により 分離し、そしてフェノール抽出及びエタノール沈毅によ り精製することにより、トリプトファン合成系遺伝子の 上流部分を含有する2.5MDの大きさのEcoR I-Xba lフラ グメントを得た。なお、前記プラスミドpSD11111を含有 する大陽菌は、工業技術院改生物工業技術研究所に做工 研蔵寄第7861号(FERMP - 7861)として寄託されてい

次に、両フラグメント約1μgずつを混合し、T4 DNA リガーゼを用いて連結反応を行い、これを用いてパチル ス・アミロリクエファシエンスのトリプトファン生産株 パチルスSD30のコンピテントセルを次の様にして形質転 検した。

まず、TBAB寒天培地 (Difco社、Bacto Tryptose10g、 Bacto Beef Extract 3g, NaCl 5g, Bacto Agar 15g;H-0 1e) で阿森培養したパチルスSD30をCI培地(M-EPO, 1 4g、KHaPO4 6g、 (NII4) 2SO4 2g、クエン酸ナトリウム ・2015 0 1g、MgSO4・7E50 5ml、グリコース5g、カザミノ 酸0.2g、レートリプトファン50ppm、H:0 1 ℓ )に0D660 が0.05になる様に接種、37℃で振とう培養し、0D660が 約0.5になった時点で遠心分離 (4000rpm、10分間) し、 沈藪をC 11培地 (K: HPO: 14g、KH: PO: 6g、 (NH:) 2 SO: 2g、クエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub> O 1g、MgSO、・7H<sub>2</sub> O 5m M、グルコース5g、カザミノ酸0.1g、L-トリプトファ "ンSoppe"で、2倍に希釈されるように懸濁した。さらに 37℃で振とう培養を続け、30分後に、逮結反応を行なっ たDRA溶液を加え、37℃で振どうを1時間行ない、テト ラサイクリンをSppm含むTBAB寒天培地に塗布した。

体が取得された。

この様にして、相同的交叉によりプロモーター?756が 染色体上のトリプトファン合成系遺伝子のすぐ上流にイ テングレーションされ、目的とするトリプトファン生産 株が得られた。この相同的交叉の結果を第2回に模式的 で示す。

例3. (穀素例) ファージSP02由来のプロモーターとト リプトファン合成系遺伝子を含有するプラスミドの創動 及びその宿主への導入(第3四)

第3図に示す出発プラスミドpSDB 136は、枯草菌ファ ージSP02由来のプロモーター (P201) を含有する0.1700 のRcoR 「フラグメントを含有し、その下流に制限酵素切 断点BamH I. Sal I及びPst lを含み、さらにその下流に バチルス・プミルス (Bacillus pumilus) 由来のクロラ ムフェニコール耐性遺伝子の構造遺伝子を含有する5MD の大きさのプラスミドである。該プラスミドはpHL708 (Gene. 16, 199 (1981) ) (Bacillus Genetic Stoch Ce nter,オハイオ・ステート・ユニパーシティーから商業 的に入手することができる。) をEcoR [とBg] [[で消化 し、EcoR 1とBamH Iで消化したDBR322と混合、T4 DNAU ガーゼで結合反応後、大脳菌c600に形質転換を行ない。 得られたクロラムフェニコール耐性の形質転換体から額 製される。

プラスミドpSDB 136を制限酵素Bam Iで消化し、次に 大腸菌DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで処理し た。他方、プラスミドpSDT 111を制限酵素EcoR Jで消化 し、次に大腸菌DNAポリメラーゼ I のKlenowフラグメン トで処理した。両DNA断片を混合した後、T4 DNAリガー ゼにより連結し、この生成物を用いてトリプトファン妻 ァン非要求性、アンビシリン耐性でかつクロラムフェニ コール耐性の形質転換体よりプラスミドを抽出、分析し てSPO2ファージ由来プロモーターとトリプトファン合成 系遺伝子を含むフラグメントが機能的に連結している大 きさ10MDの組替えプラスミドpSEY1213が得られた。

このプラスミドpSEY1213を用い、実施例1に記載した のと同様にしてパチルス・アミロリクエファシエンスの トリプトファン生産株パチルスSD-30のコンピテントセ ルを形質転換した。こうして、相同的交叉によりプロモ ーターP201が染色体上のトリプトファン合成形遺伝子の 40 すぐ上流にインテグレーションされ、目的とするトリプ トファン生産株が得られた。この相同的交叉の結果を罫 3 図に模式的に示す。

# 実施例4. トリフトファン合成系酵素類の発現

細菌染色体上のトリプトファン遺伝子近傍に、プロモ ーター配列を挿入した茵株パテルスSD1034、及びパテル スSD1035の生産する酵素トリプトファンシンセターゼお よびアントラニール位シンセターゼの量を興酵素の活性 測定により削った。

プロモーターの導入されていない親株パチルスSD30、

並びにプロモーターが導入されている株パチルス50103 4、及びバチルスSD1035をTBAB寒天培地 (Difco社) で前 培養し、Spizizen最少培地100mlにOD (660nm) が約0.03 になるように接種し、37℃でOD (660mm) が約0.5になる まで振とう培養した。5000rpa、15分間冷却造心を行 い、抗嚢をパッファーI (0.025M KH2 PO. . 0.075M K.HP 04、DH7.3、0.01M Lーグルタミン、10%グリセリン)で 洗浄這心後、2mlのバッファー11 (0.025M KH: PO4、0.07 5M K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>、PH7.3、0.01MLーグルタミン、4mM MgCl<sub>2</sub>、4 0%グリセリン) に懸濁した。リゾチーム0.5mg、DNasc5 и в 添加し、37 Сで30分間インキュペーションした。3 0.000rpmで、30分間違心し上清を粗酸素液とした。

70

Method in Engymolgy, 5,794 (1962) に従って行った トリプトファンシンセターゼ活性測定の結果、およてKge netics, 52, 1303 (1965) に従って行ったアントラニール 酸シンセターゼ活性測定の結果を示す。

菌株	トリプトファンシン セターゼ活性	アントラニール 酸シンセターゼ	
2030	100	100	
SD1034	250	300	
SD1035	300	320	

パチルスSD1034においては、P756プロモーター及びア ントラニール酸シンセターゼ遺伝子を含有するトリプト ファン合成系遺伝子の上流部分が宿主細菌の染色体上の トリプトファン合成系遺伝子の近傍に導入されており、 この結果として染色体上に元から存在したトリプトファ ン合成系の遺伝子の発現が強化されていると共に、追加 のアントラニール酸シンセターセ遺伝子が導入されてい 求性大腸南JA 221を形質転換した。得られたトリプトフ 30/る。このため、トリプトファンシンセターゼ活性が約2. 5倍に増強され、アントラニール酸シンセターゼ活性は 約3.0倍に増強された。他方、バチルスSD1035において は、トリプトファン合成系遺伝子の2倍体が形成されて おり、さらにその片方のトリプトファン合成系遺伝子近 傍にP201プロモーター配列DNAが導入されていることに より、アントラニル酸シンセターゼ活性、及びトリプト ファンシンセターゼ活性が3~3.2倍増強された。

# 実施例5. レートリプトファンの製造

グルコース5%、硫安0.2%、K-HPO, 1.4%、KH-PO, 0.6%、クエン酸ナトリウム・2H<sub>2</sub>0 1g、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>0 0, 02%、FeSO。・7時0 1ppm、MnSO。1ppmを含む培地 (pH7, 0) 2Lにアントラニル酸800ppmを添加し、これにプロモ ーターの導入されていない親株パチルスSD30、並びにプ ロモーターが導入された株パチルスSD1034、及びパチル スSD1035を植菌し、35℃で5Lのジャーファメンターで通 気撹はん培養した。培養中、アントラニル酸濃度が50pp ■以下まで減少した時点でアントラニル酸濃度が約1000p PMになるように適宜迫加添加し、また培養途中グルコー スを100g追加し、更にアンモニア水の級加により培地の 50 pHを7.0±0.4に保ちながら15時間培養した。培養液中に

若糖されたL-トリプトファンの最を高速液体クロマト グラフィーにより測定した結果を下に示す。

菌株	Lートリプトファン蓄積(g/L)					
SD30	4.7					
SD1034	8.9					
SD1035	15, 1					

トの表から明らかな様に、本発明のプロモーターの導 入によって染色体上のトリプトファン合成系遺伝子の発 現が増強されたパチルスSD1034は親株SD30に比べて約2 10 俗のトリプトファンを蓄積した。他力、プロモーターの ほかに追加のトリプトファン合成系遺伝子が導入された パチルスSD1035は親株SD30に比べて約3倍の下リプトフ ァンを密積した。

# 宝炼钢6.

パチルスSD1034、及びパチルスSD1035に於いてプロモ ーター配列DNAがトリプトファン遺伝子の近傍に導入さ れていることは次の様なサザンハイブリダイゼイション 法により確認した。

パチルスSD1034、及びパチルスSD1035をし培地300ml 20 で35℃、1夜振とう培養して、通常のDNA抽出法(Bioch em. Biophys. Acta72, 619, (1963) ) により染色体DNAを 抽出・精製し約1mgを得た。各DNA1μgずつを制限酵素B amH I、EcoR I、Xba Iで夫々完全に消化し、アガロース 截気泳動を行った。常法に従ってアルカル変性、中和 後、二トロセルロースフィルターにDNAをトランスファ ーした。フィルターを洗浄後、80℃で2時間熱処理し

プロープDNAとして別に精製したトリプトファン遺伝 子を含む5MDのRcoR (フラグメントとP756プロモーター を含む0、3MDのHind IIIフラグメントとP201プロモータ ーを含まい、18MDのRcoR 1フラグメントをニックタロンス レーション法により(ァー\*\*P)dCTPでラベルして比舌 性40 u Ci/100mgのプロープDNAを作製した。

前述のフィルターをプレイハイブリダイゼーション溶 液 (6×SSC、5×デンハルト溶液中で42℃2時間イン キュペーションの後40μCiのプローブDNAと50%ホルム アミドを含むハイブリダイゼーション溶液(6×SSC、 2×デンハルト溶液中で42℃1夜インキュペーションし

た。 次にフィルターを 2 回、37 C で15分間緩衝液 (2× 40

SSC) 中でインキュペーションし低塩濃度の緩衝液(0.1) ×SSC) に移し、2回、37℃で5分間洗浄した。フィル ターの水分を拭きとりコダックXAR5フィルムを用いて-80℃で3時間オートラジオグラフィーを行った。

その結果、パチルスSD1034の場合、BanH Iで消化した 7MDの大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグ メントプロープでも、P756を含むフラグメントプロープ でもシグナルが生じた。又、EcoR Iで消化した4.3MDの 大きさ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメント プローブでもP756を含むフラグメントプローブでもシグ ナルが生じ、更にXia Iで消化した。4.3MDの大きさ付近 にもトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプローブ でもP756を含むフラグメントプローブでもシグナルが生 じた。従ってパチルスSD1034のトリプトファン遺伝子付 近の機能は第2回のようであり、プロモーター配列がト 11プトファン潜伝子の近傍け進入されていることが確認 ant.

パチルスSD1035の場合、Xba Iで消化した10MDの大き さ付近にトリプトファン遺伝子を含むフラグメントプロ ープでもP201を含むフラグメントプローブでもシグナル が生じ、相同的交叉の結果、第3四に示すように、プロ モーター配列がトリプトファン遺伝子の近傍に導入され ていることが確認された。

# [本発明の効果]

本塾明に従えば、プラスミドを用いた遺伝子均幅と異 カカ、安定的に微生物の生産する特定の物質を多量に工 ・事的に生産することが可能となる。さらに遺伝子増幅に **競いては、目的の遺伝子が完全無傷でないとその目的を** 達成することができないが、本発明では目的遺伝子の上 液部分と任意のプロモーターDNAさえあれば、関単にそ の目的が達成される。

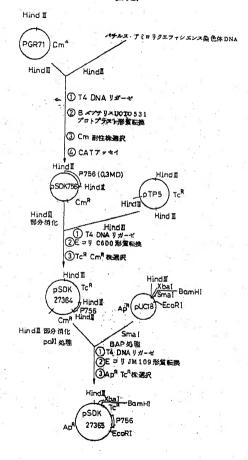
【図面の簡単な説明】

第1図は、プロモーター配列DNAのクローニング方法を 示す。

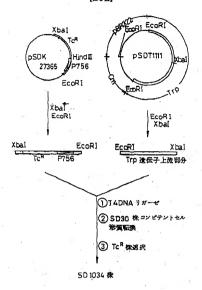
第2図は、プロモーター配列DNAとトリプトファン遺伝 子上流部分の細菌への導入方法を示す。

第3図は、プロモーター配列下流へトリプトファン遺伝 子が組み込まれたDNAの調製法、及び細菌への導入方法

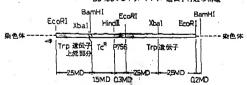
【第1図】



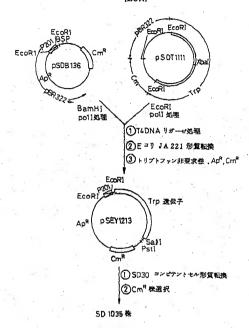
[第2図]



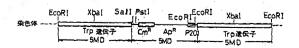
# SD 1034のトリプトファン遺伝子付近の構造



[第3図]



SD 1035 のトリプトファン遺伝子付近の構造



(C12N 1/21 C12R 1:07) (C12P 21/02 C12R 1:125) (C12P 21/02 C12R